STRESZCZENIE

Wstęp: Niepłodność to poważny problem zdrowotny młodych osób, który dotyka około 10 – 15% par. Dane epidemiologiczne wskazują, że u około 50% par przyczyną braku ciąż jest czynnik męski. Badanie nasienia pozwala na ocenę liczby plemników, ich ruchu, morfologii. Można przypuszczać, że za nieprawidłową spermatogenezę odpowiada zaburzona funkcja komórek Sertolego, co wtórnie upośledza przebieg spermatogenezy. Jak dotychczas nie ma uznanych biomarkerów pozwalających ocenić stan funkcjonalny komórek Sertolego. W plazmie nasienia obecne są produkty metabolizmu komórek Sertolego i czynniki regulujące spermatogenezę. Badania w ostatnich latach wskazują, że szczególnie przydatnym w diagnostyce mogą być AMH i mikro–RNA obecne w mikropęcherzykach (egzosomach) zawarte w plazmie nasienia.

Cele pracy: 1. Zidentyfikowanie hormonalnego biomarkera(ów) funkcji jąder związanego ze spermatogenezą w plazmie nasienia; **2.** Wytypowanie miRNA potencjalnie skorelowanych z zaburzeniami spermatogenezy; **3.** Wykazanie wpływu wybranych miRNA i AMH na komórki Sertolego w modelu doświadczalnym w hodowli komórkowej.

Materiały i metody: Badania przeprowadzono w plazmie nasienia u mężczyzn (n=310) z azoospermią, oligoastenoteratozoospermią, oligozoospermią oraz prawidłowymi parametrami według kryteriów WHO z 2010 roku. Ocenę parametrów nasienia (liczba plemników, morfologia, typ ruchu) przeprowadzono z użyciem systemu wspomaganej komputerowo analizy nasienia (CASA). We wszystkich grupach badanych oceniony został profil stężeń hormonów (testosteron, AMH, prolaktyna, estradiol i progesteron) metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA) oraz androstendion metodą chemiluminescencji (CLIA). Wyizolowane egzosomy z plazm nasienia poprzez ultrawirowanie oznaczono ilościowo metodą ELISA. Profil ekspresji wybranych miRNA (miR–let–7a, miR–let–7b, miR–let–7c, miR–100, miR–181a, miR–181b, miR–518f) w egzosomach plazmy nasienia analizowano metodą qRT–PCR. Wpływ AMH na ekspresję miR–181a i miR–181b zbadano w hodowli mysiej linii komórek Sertolego MSC–1. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku – numer uchwały R–I–002/148/2018.

Wyniki: Stężenie AMH w plazmie nasienia było istotnie obniżone w grupach z azoospermią, oligozoospermią, oligoastenoteratozoospermią ($P \leq 0.05$), a stężenie androstendionu w grupie z azoospermią ($P \leq 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ilość egzosomów w plazmie nasienia w grupach z azoospermią, oligoastenoteratozoospermią, oligoastenozoospermią, astenoteratozoospermią była zmniejszona w porównaniu do grupy kontrolnej. W egzosomach plazmy nasienia zaobserwowano obniżoną ekspresję miR–181a w grupach z azoospermią oraz oligozoospermią w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza krzywej ROC dla miR–181a i AMH wykazała czułość i swoistość = 100%, zaś AUC = 1. Nie odnotowano istotnej statystycznie zmiany ekspresji miR–181b w żadnej z badanych grup. Badania eksperymentalne na mysiej linii komórek Sertolego MSC–1 wykazały, że ekspresja miR–181a była istotnie podwyższona w komórkach Sertolego stymulowanych AMH dawkami 10 ng/ml** i 100 ng/ml* (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$) w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast ekspresja miR–181b nie zmieniała się niezależnie od użytej dawki. Wykazano również, że AMH w dawce 10 ng/ml istotnie statystycznie stymuluje proliferację komórek MSC–1 ($P \leq 0.05$). AMH nie wpływało na ekspresję *Amhr2*. Inhibitor miR–181a statystycznie obniżał proliferację komórek MSC–1. Stymulacja komórek MSC–1 AMH z inhibitorem miR–181a, jak również aktywatorem miR–181a, nie wpływała na ekspresję miR–181a. Inhibitor miR–181a istotnie obniżał, natomiast aktywator miR–181a podwyższał ekspresję miR–181a w komórkach MSC–1. Stymulacja AMH razem z aktywatorem miR–181a nie wykazała żadnego addytywnego efektu podwyższenia ekspresji miR–181a.

Wnioski: 1. AMH i miRNA–181a uczestniczą w regulacji funkcji komórek Sertolego; **2.** Oznaczanie stężenia AMH, zawartości AMH oraz ekspresji miR–181a w plazmie nasienia można wykorzystać do diagnostyki stanu funkcjonalnego komórek Sertolego; **3.** Obniżone stężenie AMH, zawartość AMH i niska ekspresja miR–181a w plazmie nasienia wskazują u pacjentów z oligozoospermią / azoospermią na zaburzoną funkcję komórek Sertolego; **4.** Pomiary pozostałych badanych hormonów i miRNA nie można zastosować do oceny funkcji komórek Sertolego przy zaburzeniach spermatogenezy.